UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

288

O. VERONA e G. PICCI

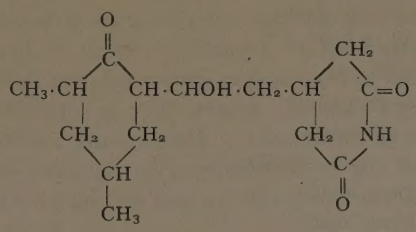
# Intorno all'azione inibitrice dell'actidione sui lieviti della fermentazione vinaria

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
3 MAR 1954

Dai « Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei »
(Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali)
serie VIII, vol. XIV, fasc. 5 - maggio 1953

**Microbiologia.** — *Intorno all'azione inibitrice dell'actidione sui lieviti della fermentazione vinaria* (*). Nota di ONORATO VERONA e GIOVANNI PICCI, presentata (**) dal Socio A. CHIARUGI.

Come è noto l'actidione è un sottoprodotto della fabbricazione della streptomicina (1). Ottenuto puro in forma cristallina da Leach, Ford e Whiffen nel 1947 (2) è stato visto trattarsi del β-[2-(3,5-dimetil-2-ossocicloesil)-2-idrossietil]-glutarimide (3):



All'actidione si riconoscono forti qualità antibiotiche; tuttavia, a differenza della streptomicina, tali azioni antibiotiche interessano più che gli schizomiceti gli eumiceti incluso, in questi, funghi fitopatogeni e lieviti.

Per quanto si riferisce ai lieviti, dei quali qui ci occupiamo, un esteso spettro è stato presentato da Whiffen (op. cit.):

*Spettro di azione dell'actidione verso i lieviti*

| | γ/cc. dose inibente |
|---|---|
| *Nematospora phaseoli* | 0.17 |
| *Pichia membranaefaciens* | 0.17 |
| *Saccharomyces carlsbergensis* | 0.17 |
| » *ellipsoideus* | 0.17 |
| » *fragilis* | 0.17 |
| » *pastorianus* | 0.17 |

(*) Dall'Istituto di Patologia vegetale e Microbiologia agraria dell'Università di Pisa.

(**) Nella seduta del 9 maggio 1953.

(1) Devesi tuttavia notare come il rapporto di produzione actidione-streptomicina vari, secondo la composizione del mezzo, spostandosi ad esempio da 49/225 a 232/164 sì che l'actidione può divenire, in certe condizioni, composto principale anziché secondario. (Cfr. A. J. WHIFFEN, *The production, assay, and antibiotic activity of actidione.* « J. Bact. », vol. 56, p. 283 (1948).

(2) B. E. LEACH, H. J. FORD e A. J. WHIFFEN, *Actidione, an antibiotic from Streptomyces griseus.* « J. Am. Chem. Soc. », vol. 69, p. 474 (1947).

(3) E. C. KORNFELD, R. G. JONES e T. V. PARKE, *The structure and chemistry of actidione, an antibiotic from Streptomyces griseus.* « J. Am. Chem. Soc. », vol. 71, p. 150 (1949).

| | γ/cc. dose inibente |
|---|---|
| *Schwanniomyces occidentalis* | 0.17 |
| *Sporobolomyces salmonicolor* | 0.17 |
| *Torulaspora fermentati* | 0.17 |
| *Cryptococcus neoformans* | 0.24 |
| *Rhodotorula glutinis* | 0.31 |
| *Hansenia apiculata* | 0.62 |
| *Hansenula anomala* | 2.5 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 10— |
| *Torula utilis* | 10— |
| *Asporomyces uvae* | 25— |
| *Debaryomyces globosus* | 25— |
| *Schizosacch. pombe* | 25— |
| *Candida albicans* | > 1.000 |
| *Endomyces magnusii* | > 1.000 |
| *Kloeckera apiculata* | > 1.000 |
| *Mycotorula roseo-corallina* | > 1.000 |
| *Pityrosporum ovale* | > 1.000 |
| *Saccharomyces lactis* | > 1.000 |

Nel rilevare la diversa sensibilità delle varie specie, con riferimento a quelle che maggiormente interessano la fermentazione vinaria, abbiamo, tra le più sensibili, inibite cioè nel loro sviluppo per dosi di mg. 0,17/l, il gruppo degli ellittici, mentre tra le meno sensibili, resistenti cioè anche alla dose di gr. 1/l, il gruppo degli apiculati.

Questi reperti di Whiffen sono stati, in epoca recente (e mentre noi si stava per dare inizio alle presenti ricerche) raccolti anche da Ribéreau-Gayon e Peynaud [4] i quali hanno condotto interessanti indagini sugli effetti inibitori dell'actidione sopra mosti inoculati con *Sacch. ellipsoideus*. I ricordati AA. hanno trovato che mezzo milligrammo di actidione per litro di mosto ritarda di due giorni l'inizio della fermentazione; un milligrammo spinge a 4-5 giorni questo ritardo che si fa infine di 12 giorni circa quando l'actidione sia presente nella quantità di 5 mg. per litro. Quantità pari a mg. 7.5/l bloccano completamente la fermentazione sempre in quanto sia dovuta a lieviti ellittici. Per altre specie, in accordo con le prime indagini di Whiffen, occorrono quantità maggiori: almeno mg. 10/l per *Torulaspora Rosei* e le *Hansenula* e mg. 50/l per gli apiculati.

Nell'occuparci dell'argomento noi abbiamo inteso, anzitutto, stabilire l'azione dell'actidione sullo sviluppo di alcuni ceppi di *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* di diversa provenienza. A questo scopo ceppi diversi di

(4) J. RIBEREAU-GAYON e E. PAYNAUD, *Action inhibitrice sur les levures de la vitamine* $K_5$ *et de quelques antibiotiques*. « Ac. d'Agr. Fr. », 1952.

ellittico sono stati coltivati in adatto liquido nutritivo sintetico [5] addizionato o non di actidione [6] seguendone quindi lo sviluppo attraverso l'intorbidamento del liquido. Dal protocollo delle esperienze togliamo i dati relativi a quattro ceppi etichettati, secondo la provenienza, con i termini di « Asti », « Chianti », Umbria », « Puglie ».

Come era facile pensare non tutti i ceppi di lievito ellittico manifestano lo stesso comportamento di fronte ad uguali dosi di actidione. Tra i ceppi sperimentati una differenza profonda, ad esempio, si è trovata (per limitarci ai casi di cui abbiamo riportato i dati) tra un ceppo proveniente dallo Astigiano dimostratosi sensibilissimo, e un ceppo del Chianti per contro relativamente resistente. La differenza è tale che mentre in presenza di mg. 0,75/l di actidione il ceppo « Asti » non accenna a svilupparsi neppure trascorsi venti giorni, il ceppo « Chianti », in presenza della stessa dose, ritarda lo sviluppo di soli due giorni raggiungendo, sempre in questo caso, il massimo dello sviluppo al 7°–8° giorno. Gli altri ceppi hanno dimostrato comportamento tra loro paragonabile e intermedio ai ricordati casi estremi avendosi ritardo di sviluppo proporzionalmente alle quantità di actidione presenti nel mezzo, ritardo che sale ad 8–9 giorni per la dose massima sperimentata di mg. 0.75/l.

Indipendentemente dalla ricognizione delle curve di sviluppo, per il ceppo proveniente da materiale del Chianti dimostratosi così resistente all'actidione, si è voluto seguire le curve di fermentazione in mosto variamente addizionato del composto fino alla quantità massima di mg. 1,5/l.

(5) Il liquido nutritivo usato aveva la seguente composizione:

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| glucosio | gr. 50.— | | | | | | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | » 6.— | | | | | | |
| $KH_2PO_4$ | » 2.— | | | | | | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | » 0.25 | | | | | | |
| $CaCl_2$ | » 0.25 | | | | | | |
| $H_3BO_3$ (1 °/oo) | cc. 1 | biotina | γ | 25 | per | 1000 cc. |
| $ZnSO_4$ » | » 1 | tiamina | mg. | 0.5 | » | » |
| $MnCl_2$ » | » 1 | m-inositolo | » | 25 | » | » |
| $Tl_2SO_4$ » | » 1 | Ca-pantotenato | » | 2.5 | » | » |
| $FeCl_3$ (0.5 °/oo) | » 1 | piridossina | » | 0.5 | » | » |
| $CuSO_4$ (1 °/oo) | » 1 | | | | | |
| KJ (0.1 °/oo) | » 1 | | | | | |
| Acqua d. fino a | » 1000 | | | | | |

(Liq. di WILLIAMS, ripreso da T. WIKEN e O. RICHARD, *Untersuchungen über die physiologie der Weinhefen*, I Mitt. « Ant. v. Leeuwenhoek », vol. 17, p. 209 (1951).

(6) Per questa ricerca, come per le altre ricerche, l'aggiunta di actidione ai mezzi colturali è stata eseguita tenendo presenti gli accorgimenti suggeriti da: G. B. PHILLIPS e E. HANEL, *Control of mold contaminants on solid media by the use of actidione*. « J. Bact. », vol. 60, p. 104 (1950).

Quantità sufficienti di actidione ci furono cortesemente offerti da The Upjhon Co. di Kalamazoo (Michigan) che ben vivamente ringraziamo.

*Comportamento di alcuni ceppi di lievito ellittico in mezzo sintetico fermentescibile contenente quantità varie di actidione (Indice dell'intensità di sviluppo l'intorbidamento dei liquidi colturali; misurazione a mezzo di colorimetro a cella fotoelettrica).*

| Ceppo | Dopo giorni | Controllo | Actidione mg/l | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0.10 | 0.175 | 0.25 | 0.50 | 0.75 |
| « Asti » | 1 | 7 | — | — | — | — | — |
| | 2 | 25 | — | — | — | — | — |
| | 3 | 84 | — | — | — | — | — |
| | 4 | 95 | 8 | 8 | — | — | — |
| | 5 | 97 | 20 | 21 | — | — | — |
| | 6 | 97 | 51 | 50 | — | — | — |
| | 7 | | 76 | 75 | 4 | — | — |
| | 8 | | 92 | 94 | 13 | — | — |
| | 9 | | 95 | 96 | 30 | 5 | — |
| | 10 | | 97 | 96 | 54 | 19 | — |
| | 11 | | | | 75 | 29 | — |
| | 12 | | | | 89 | 44 | — |
| | 13 | | | | 94 | 57 | — |
| | 14 | | | | 97 | 72 | — |
| | 15 | | | | | 83 | — |
| | 16 | | | | | 92 | — |
| | 17 | | | | | 96 | — |
| | 20 | | | | | | — |
| « Chianti » | 1 | 30 | 8 | 4 | — | — | — |
| | 2 | 81 | 35 | 17 | 12 | 6 | — |
| | 3 | 94 | 79 | 63 | 40 | 28 | 8 |
| | 4 | 97 | 95 | 92 | 85 | 60 | 28 |
| | 5 | | 97 | 96 | 91 | 88 | 55 |
| | 6 | | | 96 | 96 | 94 | 76 |
| | 7 | | | | | 97 | 91 |
| | 8 | | | | | | 96 |
| « Umbria » | 1 | 22 | 4 | — | — | — | — |
| | 2 | 70 | 19 | — | — | — | — |
| | 3 | 91 | 50 | 11 | — | — | — |
| | 4 | 95 | 78 | 45 | 4 | — | — |
| | 5 | 97 | 92 | 76 | 16 | — | — |
| | 6 | | 95 | 93 | 53 | tr. | — |
| | 7 | | 96 | 97 | 86 | 13 | — |
| | 8 | | | | 95 | 55 | — |
| | 9 | | | | 97 | 87 | 6 |
| | 10 | | | | | 94 | 22 |
| | 11 | | | | | 97 | 49 |
| | 12 | | | | | | 79 |
| | 13 | | | | | | 93 |
| | 14 | | | | | | 97 |
| « Puglia » | 1 | 11 | 4 | — | — | — | — |
| | 2 | 58 | 18 | — | — | — | — |
| | 3 | 91 | 55 | 6 | — | — | — |
| | 4 | 96 | 85 | 30 | tr. | — | — |
| | 5 | 96 | 95 | 68 | 14 | — | — |
| | 6 | | 97 | 90 | 48 | 4 | — |
| | 7 | | | 94 | 85 | 18 | — |
| | 8 | | | 97 | 92 | 62 | — |
| | 9 | | | | 96 | 93 | 6 |
| | 10 | | | | | 96 | 24 |
| | 11 | | | | | 97 | 58 |
| | 12 | | | | | | 84 |
| | 13 | | | | | | 95 |
| | 14 | | | | | | 97 |

L'esperienza, condotta su di un buon mosto contenuto in matracci muniti di valvola ad acido solforico per la periodica determinazione dell'anidride carbonica, ha dato i risultati seguenti:

*Sviluppo di* $CO_2$ *in gr. per 100 cc. di mosto non contenente o contenente actidione, inoculato con « Sacch. ellipsoideus » « Chianti » e incubato a 24–25° C.*

| Giorni | Controllo | Actidione mg/l | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.25 | 0.50 | 0.75 | 1 | 1.25 | 1.50 |
| 1 | 0.280 | — | — | — | — | — | — |
| 2 | 0.910 | 0.302 | — | — | — | — | — |
| 3 | 1.890 | 1.005 | 0.430 | 0.318 | — | — | — |
| 4 | 2.960 | 2.010 | 1.445 | 1.320 | — | — | — |
| 5 | 4.305 | 3.090 | 2.570 | 2.360 | — | — | — |
| 6 | 5.417 | 4.375 | 3.750 | 3.575 | — | — | — |
| 7 | 6.515 | 5.450 | 4.930 | 4.780 | — | — | — |
| 8 | 7.602 | 6.610 | 6.005 | 5.690 | — | — | — |
| 9 | 8.710 | 7.630 | 7.180 | 6.750 | — | — | — |
| 10 | 9.506 | 8.502 | 8.010 | 7,750 | — | — | — |
| 11 | 10.080 | 9.185 | 8.750 | 8.504 | 0.180 | — | — |
| 12 | 10.460 | 9.704 | 9.410 | 9.244 | 0.397 | 0.176 | — |
| 13 | 10.602 | 10.203 | 9.802 | 9.650 | 0.744 | 0.358 | — |
| 14 | 10.625 | 10.510 | 10.136 | 9.920 | 0.912 | 0.680 | tr. |
| 15 | 10.631 | 10.602 | 10.221 | 9.990 | 1.060 | 0.891 | 0.112 |
| 16 | | 10.664 | 10.300 | 10.004 | 1.180 | 1.003 | 0.184 |
| 17 | | 10.680 | 10.316 | 10.010 | 1.220 | 1.175 | 0.240 |
| 18 | | 10.682 | 10.318 | 10.010 | 1.273 | 1.214 | 0.315 |
| 19 | | | | | 1.304 | 1.295 | 0.378 |
| 20 | | | | | 1.312 | 1.298 | 0.414 |
| 21 | | | | | 1.315 | 1.300 | 0.421 |

Il rilevato andamento del processo fermentativo conferma come questo ceppo resista abbastanza bene alla dose di mg. 0.75/l di actidione. Come si raggiunge, però, la dose di mg. 1/l l'azione antifermentativa del composto appare molto più energica in quanto il mosto rimane muto per 10–11 giorni

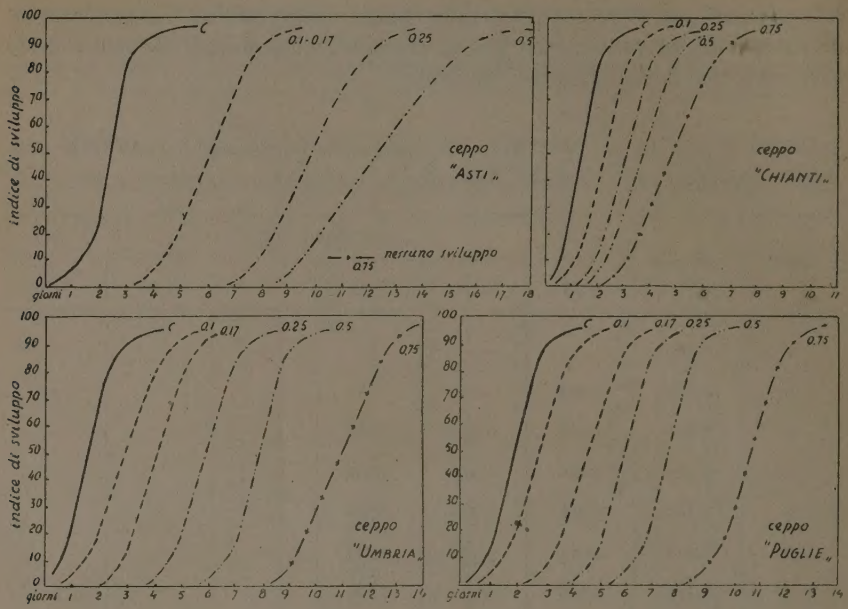



Fig. 1. – Diverso sviluppo di vari ceppi di *Sacch. ellipsoideus* in mezzo contenente quantità diverse di actidione.

mentre la stessa fermentazione procede con grandissima lentezza. In presenza di mg. 1.5/l la fermentazione praticamente si arresta non dosandosi che piccolissime quantità di gas al 21° giorno.

Sempre con riferimento al lievito ellittico si è voluto quindi precisare l'azione microbicida dell'actidione.

A tal uopo abbiamo preparato una sospensione di cellule, numericamente controllata, in acqua distillata e in soluzioni di actidione di mg. 0.5/l,

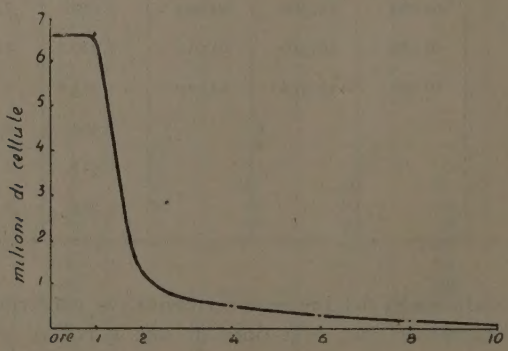



Fig. 2. – Curva di sopravvivenza di cellule di lievito ellittico sottoposte all'azione dell'actidione (mg. 1/l) per tempi diversi.

mg. 0.75/l e mg. 1/l. Di tempo in tempo, e cioè dopo 1–2–3 ··· 10 ore si è proceduto alla conta delle cellule capaci ancora di svilupparsi. La conta si è effettuata inficiando piastre con un volume noto della sospensione cellulare previamente e opportunamente diluita in un determinato volume di acqua sterile. Mezzo di coltura agar–malto; conta dopo 4 giorni di incubazione a 25–26° C.

*Sopravvivenza di cellule di « Sacch. ellipsoideus » in acqua contenente actidione, in funzione del tempo (n. di cellule per cc.).*

| Tempo di azione (ore) | In acqua distill. (controllo) | In acqua dist. contenente actidione mg/litro | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 0.75 | 1 |
| inizio | 6.450.000 | 6.050.000 | 6.710.000 | 6.500.000 |
| 1 | 6.820.000 | 6.310.000 | 6.370.000 | 6.620.000 |
| 2 | 6.345.000 | 6.420.000 | 6.510.000 | 1.310.000 |
| 4 | 6.510.000 | 6.160.000 | 6.160.000 | 470.000 |
| 6 | 6.770.000 | 6.200.000 | 6.050.000 | 210.000 |
| 8 | 6.390.000 | 6.330.000 | 6.680.000 | 70.000 |
| 10 | 6.455.000 | 6.020.000 | 6.330.000 | 30.000 |

Una permanenza delle cellule, anche di 10 ore, in mezzo contenente mg. 0.75/l. di actidione non è sufficiente a devitalizzarle. Ove la concentrazione della sostanza salga però a mg. 1/l, nei limiti di tempo di 10 ore la quasi totalità delle cellule non si dimostra più capace di svilupparsi. Ciò comprova, evidentemente, l'azione microbicida del composto.

Finalmente, a complemento di quanto riferito, si è cercato di stabilire le quantità minime di actidione necessarie ad inibire lo sviluppo di altre specie di lieviti, diverse dal lievito ellittico, aventi interesse enologico.

Sono stati raccolti i seguenti risultati:

| | dose inibente γ/cc. |
|---|---|
| *Kloeckera apiculata* (in più ceppi) . . . . . | > 1000 < 1500 |
| *Candida mycoderma* (ex *Mycoderma vini*, ecc.) . . | 1.5 |
| *Pichia membranaefaciens* . . . . . | 0.2 |
| *Candida pulcherrima* (in più ceppi) . . . . . | 10–20 |
| *Saccharomyces oviformis* . . . . . | 0.8 |
| » *chevalierii* . . . . . | 0.2 |
| » *manginii* . . . . . | 1–1.2 |

Concludendo: l'actidione dimostra esercitare sui lieviti un potere antibiotico veramente notevole. Tale potere antibiotico varia, peraltro, a seconda le specie e, per quanto qui si è rilevato nei riguardi del lievito ellittico, anche a seconda dei ceppi.

In particolare, per quanto si riferisce ai lieviti di interesse enologico l'azione dell'actidione si porta, in modo del tutto evidente, sul lievito ellittico (come anche su specie minori); azione notevolmente più debole (da $\gamma$ 1/cc. a $\gamma >$ 1000/cc.) manifesta invece, questo composto, verso i lieviti apiculati.

In conseguenza, il possibile impiego di questa sostanza quale antifermentativo non può essere esteso a quei casi – come nella maggior parte delle applicazioni enologiche – in cui l'attacco del mosto o di altri mezzi fermentescibili possa essere dovuto a lieviti di tipo apiculato. In enologia ne rimane possibile l'applicazione – come suggeriscono Ribéreau-Gayon e Peynaud – quando si vogliano stabilizzare vini dolci provenienti da mosti fermentati in purezza.

Finalmente, il fatto già noto che l'actidione rispetti entro certi limiti la flora batterica può essere considerato come vantaggioso là dove si abbia interesse a non impedire l'attività di alcuni gruppi di germi, come ad esempio, i fermenti malo-lattici; meno vantaggioso nei casi in cui si voglia prevenire lo sviluppo di germi causa di alterazione (f. acetici, f. mannitici, del girato, ecc.).

Roma, 1953. — Dott. G. Bardi, Tipografo dell'Accademia Nazionale dei Lincei.